doi 10.3969/j.issn.1673-4254.2016.07.04 J South Med Univ, 2016, 36(7): 898-903

基础研究

埃兹蛋白477位酪氨酸的磷酸化在神经生长因子前体促进乳腺癌细胞侵袭中起关键作用

李福喜[1],邵文凤[1],唐芮[1],于晓然[1],温桥生[1],余焱林[2],熊静波[1]
[1]南方医科大学基础医学院细胞生物学教研室,广东 广州 510515;[2]国立癌症研究所肿瘤生物与遗传实验室,国立卫生研究院,马里兰州贝塞斯达市 美国

摘要:目的 研究神经生长因子前体(precursor of nerve growth factor, proNGF)促进乳腺癌细胞侵袭的作用与埃兹蛋白(ezrin)表达水平及其567位苏氨酸(Thr567)和477位酪氨酸(Tyr477)的磷酸化的相互关系。**方法** 用梯度浓度的proNGF(0、2.5、5和10 ng/mL)刺激人乳腺癌细胞系MDA-MB-231和MCF-7,用Transwell侵袭实验检测proNGF对MDA-MB-231和MCF-7侵袭的影响;用免疫印迹法检测ezrin蛋白的表达水平,ezrin Thr567和ezrin Tyr477磷酸化水平的变化;在MDA- MB-231中转染pEnter-His-ezrinY477F质粒(ezrin显性负突变质粒),研究ezrin Tyr477磷酸化在proNGF促进乳腺癌细胞侵袭中的作用。**结果** proNGF以浓度依赖的方式促进MDA-MB-231和MCF-7的侵袭(P<0.05);proNGF以浓度依赖和时间依赖的方式显著升高ezrin Tyr477磷酸化,而对ezrin蛋白的表达以及其Thr567磷酸化无明显影响;Src激酶特异抑制剂SKI-606显著抑制proNGF对ezrin Tyr477磷酸化的促进作用;转染pEnter-His-ezrinY477F抑制proNGF对MDA-MB-231细胞ezrin Tyr477磷酸化和侵袭能力的促进作用(P<0.05)。**结论** ezrin Tyr477磷酸化在proNGF促进乳腺癌细胞侵袭中起关键作用;proNGF通过激活Src激酶使ezrin Tyr477发生磷酸化。
关键词:乳腺癌;神经生长因子前体;埃兹蛋白;侵袭

Phosphorylation of ezrin Tyr477 is critical in invasion of breast cancer cells stimulated by precursor of nerve growth factor

LI Fuxi[1], SHAO Wenfeng[1], TANG Rui[1], YU Xiaoran[1], WEN Qiaosheng[1], YU Yanlin[2], XIONG Jingbo[1]
[1]Department of Cell Biology, School of Basic Medical Sciences, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; [2]Laboratory of Cancer Biology and Genetics, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA

Abstract: Objective To investigate the effect of precursor of nerve growth factor (proNGF) in promoting invasion of breast cancer cells and its relation with ezrin expression and phosphorylation of ezrin Thr567 and Tyr477. **Methods** Human breast cancer cell lines MDA-MB-231 and MCF-7 were stimulated by gradient concentrations of proNGF (0, 2.5, 5 and 10 ng/mL) for 16 h, and the invasion of the cells was assessed with Transwell assay. The expression of ezrin and the phosphorylation of ezrin Thr567 and ezrin Tyr477 in the treated cells were examined by Western blotting. MDA-MB-231 cells were transfected with pEnter-His-ezrinY477F (a dominant negative mutant) to study the role of phosphrylation of ezrin Tyr477 in the invasion of breast cancer cell stimulated by proNGF. **Results** proNGF significantly promoted MDA-MB-231 and MCF-7 cell invasion in a concentration-dependent manner (P<0.05), and concentration- and time-dependently increased the phosphorylation of ezrin Tyr477 (P<0.05) without affecting the expression of ezrin or the phosphorylation of ezrin Thr567. The specific inhibitor of src, SKI-606, significantly inhibited the phosphorylation of ezrin Tyr477 induced by proNGF. Transfection with pEnter-His-ezrinY477F inhibited proNGF-induced invasion and phosphorylation of ezrin Tyr477 in MDA-MB-231 cells (P<0.05). **Conclusion** Phosphorylation of ezrin Tyr477 plays a critical role in the invasion of breast cancer cells stimulated by proNGF via proNGF/src/ezrin Tyr477 pathway.
Key words: breast cancer; precursor of nerve growth factor; ezrin; invasion

收稿日期:2016-01-15
基金项目:国家自然科学基金(81071810,81172058)
Supported by National Natural Science Foundation of China (81071810, 81172058).
作者简介:李福喜,硕士研究生,电话:020-62789095,E-mail: 514380534@qq.com
通信作者:熊静波,教授,电话:020-62789029,E-mail: jbxiong@smu.edu.cn

乳腺癌的转移复发是乳腺癌死亡的主要原因,但转移复发的机制仍有待深入研究。自分泌在乳腺癌的发生发展和转移中起重要作用,乳腺癌细胞通过自分泌多种蛋白质,包括生长因子,如神经细胞生长因子[1]、血小板源生长因子[2]、肝细胞生长因子[3]和胰岛素样生长因子2[4]等促进乳腺癌细胞的增殖、迁移、侵袭及癌细胞在异位的生长。最近的研究发现,癌细胞可自分泌神经生长因子(nerve growth factor, NGF)[1]和神经生长因子前

体(precursor of nerve growth factor, proNGF)[5]促进乳腺细胞的上皮间质转化及侵袭,乳腺浸润性导管癌和proNGF的表达高度相关;相对于NGF,proNGF只需极低的浓度就可促进乳腺癌细胞侵袭,提示乳腺癌细胞通过自分泌proNGF促进乳腺癌转移的可能性更大,因此研究proNGF促进乳腺癌转移的机制尤为重要。Demont的研究表明[5],proNGF促进乳腺癌细胞侵袭与Src的激活相关联,尽管Src[6]的异常激活与肿瘤转移有关,但proNGF促进乳腺癌转移是否依赖于Src的激活,以及Src的激活的是何种下游分子却有待进一步阐明,因为Src有多种底物[7],参与不同的信号途径[8-9]。

埃兹蛋白(ezrin)是细胞骨架蛋白ERM(ezrin-radixin-moesin)家族中的一员,相对分子质量为69 000,通过连接细胞膜和细胞骨架参与许多细胞动力学过程,如丝状伪足的形成和稳定、细胞黏附、迁移等[10-12]。研究表明,ezrin表达升高与乳腺癌的不良预后有关[13],敲低乳腺癌细胞ezrin可抑制乳腺癌细胞的侵袭能力[13]。不但ezrin表达高低与乳腺癌转移有关,而且,ezrin Thr567的磷酸化与乳腺癌转移有关系,因为ezrin的激活有赖于ezrin Thr567的磷酸化[14]。ezrin Thr567[13]和ezrin Tyr477[15]磷酸化与肿瘤转移有关。Mak等的研究表明[15],Src是磷酸化ezrin Tyr477的激酶。

由于proNGF可使Src激活,而Src可使ezrin Tyr477磷酸化,我们假设proNGF促进乳腺癌细胞的侵袭的机制是通过其激活Src而使ezrin Tyr477磷酸化。我们的研究加深了对proNGF促进乳腺癌转移机制的了解。

1 材料和方法

1.1 细胞株

人乳腺癌MDA-MB-231细胞株购自中科院上海细胞库。人乳腺癌MCF-7细胞株购自美国模式培养物保藏所(American Type Culture Collection,美国)。

1.2 主要试剂

L15、DMEM细胞培养液及胰酶购自Hyclone公司(美国);胎牛血清购自Gibco公司(美国);proNGF重组蛋白购自Alomone公司(以色列);SKI-606购自Selleck公司(美国);Transwell小室、Matrigel基质胶、PVDF膜购自BD公司(美国);兔抗人pTrkA、兔抗人TrkA、兔抗人pSrc、兔抗人Src、兔抗人ezrin、兔抗人pezrin Thr567购自Cell Signaling Technology公司(美国);兔抗人pezrin Tyr477购自Sigma公司(美国);鼠抗人β-actin、山羊抗兔IgG、山羊抗鼠IgG购自武汉博士德生物工程有限公司(中国);Lipofectamine™3000转染试剂以及引物合成购自Invitrogen公司(美国);pEnter-His,pEnter-His-ezrin质粒购自山东维真生物科技有限公司(中国);基因定点突变试剂盒购自碧云天公司(中国)。

1.3 细胞培养

人乳腺癌细胞株MDA-MB-231培养于含10%胎牛血清的L-15培养基中,人乳腺癌细胞株MCF-7培养于含10%胎牛血清的DMEM培养基中,37 ℃,5% CO_2培养箱内培养,常规更换生长液,消化传代,取处于对数生长期的细胞用于实验。

1.4 Transwell小室检测细胞的侵袭能力

取5 μL Matrigel基质胶溶于95 μL DMEM基础培养基,加入到Transwell小室(孔径8 μm)中,在37 ℃孵箱静置1 h,小心吸除小室中未凝液体备用。取对数生长期细胞,消化离心,用无血清培养基稀释细胞至3×10^5/mL,每个小室中加入300 μL细胞悬液,下室每孔加入含5%胎牛血清的培养基800 μL,按照实验目的在上室中加入一定浓度的proNGF,培养16 h后取出小室,用棉签擦去小室上层未侵袭的细胞,4%多聚甲醛固定15 min,0.1%结晶紫染色30 min。显微镜下拍摄,在400×视野下取上、下、左、右、中5个视野拍摄,计数。侵袭增长率=(实验组细胞数-对照组细胞数)/对照组细胞数。

1.5 免疫印迹实验检测蛋白表达

将细胞消化后接种到12孔板,1×10^4个细胞每孔。在细胞贴壁之后,用无血清培养基饥饿处理24 h,再加药处理。处理完毕后弃上清,用预冷的PBS洗涤细胞2次,吸净液体。将细胞放置在冰上,加入1 mL预冷的PBS,细胞刮刀刮下细胞,离心收集。向每管细胞中加入100 μL RIPA裂解液,冰上裂解30 min,12 000 *g*,4 ℃离心10 min,取上清,BCA法测定总蛋白浓度。蛋白样品上样前加入上样缓冲液,100 ℃金属浴加热5 min,12 000 *g*离心3 min,可直接用于蛋白免疫印迹,每孔上样等量总蛋白。SDS-PAGE分离蛋白,转膜至PVDF膜,5%脱脂牛奶摇床上室温封闭1 h,加入相关蛋白的一抗4 ℃孵育过夜(一抗均以1:1000比例稀释于5%BSA中);二抗室温孵育1 h(羊抗鼠、羊抗兔二抗均以1:3000比例稀释于5%脱脂牛奶中),ECL显影。

1.6 质粒转染

转染前1 d,4×10^4细胞接种于24孔板,在24 h内细胞汇合达到70%~90%。分别将1 μg质粒,2 μL lipo3000和2 μL p3000溶于50 μL Optimem无血清培养基中,混匀室温静置5min,再将质粒和lipo3000、p3000混合,室温下静置20 min。将100 μL混合好的复合物加到培养板中,来回轻柔摇晃细胞培养板,在CO_2培养箱中37 ℃温育24~48 h后,进行转染后的后续实验。

1.7 基因定点突变

根据基因定点突变试剂盒上说明,设计并合成引入ezrin Tyr477突变位点的一对互补PCR引物,将编码野生型ezrin第477位酪氨酸(ezrin Y477)的密码子TAC改为TTC,使ezrin第477位酪氨酸转变苯丙氨酸,成为

ezrin Y477F突变体,使连接后的PCR产物成为ezrin显性负突变质粒pEnter-His-ezrinY477F。这一对引物的序列为:5'-CCACCACCCCCCGTGTTCGAGCCGGTGAGCTAC-3'; 5'-GTAGCTCACCGGCTCGAACACGGGGGGTGGTGG-3'。黑体碱基为引入的突变,使ezrin第477位酪氨酸转变苯丙氨酸(ezrinY477F)。以pEnter-His-ezrin质粒作为模板,按照说明书加入上述引物以及PCR反应试剂,PCR反应进行基因点突变。反应完成后加入*Dpn* Ⅰ酶消化1 h,降解掉模板质粒。*Dpn* Ⅰ酶消化完毕后直接取10 μL产物加入到100 μL感受态细菌中转化,涂布在卡那抗性平板上,培养过夜,次日挑取单个克隆扩增鉴定。

1.8 统计学分析

实验数据均以均数±标准差表示,采用SPSS13.0软件对数据进行单因素方差分析,两两比较用SNK法。当*P*<0.05时认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 proNGF促进乳腺癌细胞MDA-MB-231和MCF-7的侵袭能力

Transwell侵袭实验显示,对MDA-MB-231细胞和MCF-7细胞分别用2.5、5、10 ng/mL这3个浓度的proNGF处理16 h后,随着proNGF浓度的增加,MDA-MB-231细胞和MCF-7细胞穿过基质胶的数量逐步增加,说明两种乳腺癌细胞的侵袭能力随着proNGF浓度升高而逐渐增强(图1A)。与对照组相对比,MDA-MB-231细胞在10 ng/mL的proNGF处理下侵袭增长率为686%(图1B),MCF-7为388.9%(图1C)。

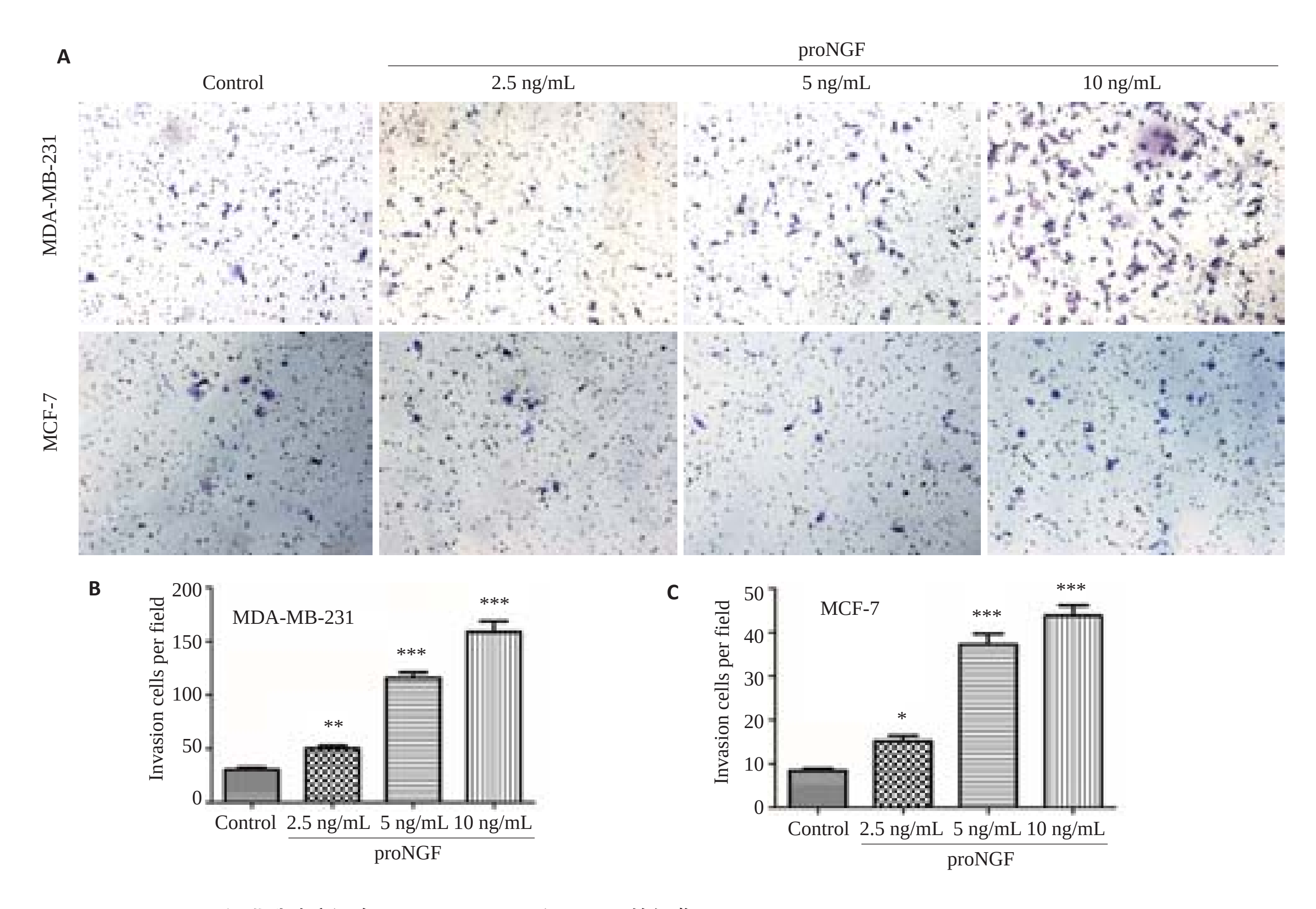


图1 proNGF促进乳腺癌细胞系MDA-MB-231和MCF-7的侵袭

Fig.1 proNGF promotes the invasion of breast cancer cell line MDA-MB-231 and MCF-7. ***A***: Transwell assay (Original magnification: ×400); ***B***, ***C***: Quantitative analysis of cell invasion. **P*<0.05; ***P*<0.01; ****P*<0.005.

2.2 proNGF促进ezrin Tyr477的磷酸化

用proNGF处理MDA-MB-231细胞60 min,与对照组相比,5、10 ng/mL proNGF处理MDA-MB-231细胞,ezrin的表达和ezrin Thr567位点的磷酸化均未产生变化,而ezrin Tyr477位点的磷酸化随着proNGF刺激显著性提高,并且具有浓度依赖效应(图2A)。如图2B所示,ezrin Tyr477位点的磷酸化随着proNGF(10 ng/mL)处理时间增长而递增,表现出时间依赖效应。

2.3 proNGF通过激活Src激酶使得ezrin Tyr477磷酸化

proNGF促进乳腺癌细胞转移,并且和Src激酶激

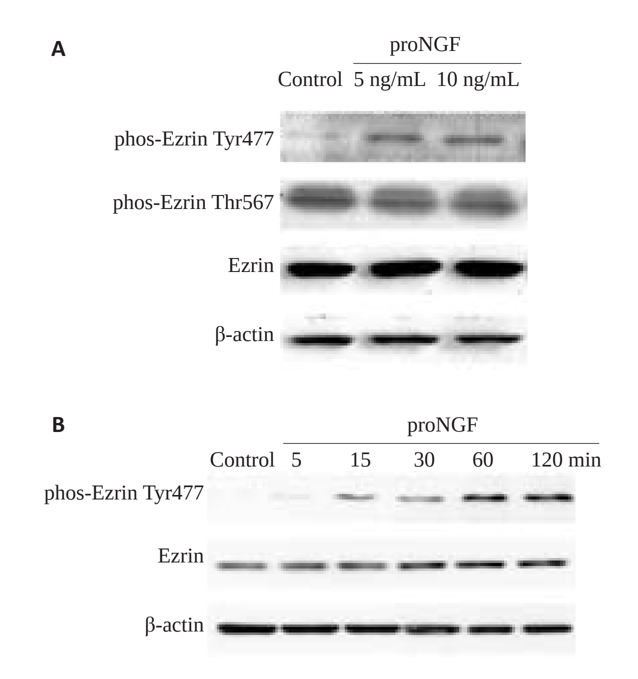


图2 proNGF促进MDA-MB-231细胞ezrin Tyr477的磷酸化

Fig.2 proNGF increases the phosphorylation of ezrin Tyr477 in MDA-MB-231 cells in a concentration-dependent (*A*) and time-dependent (*B*) manner.

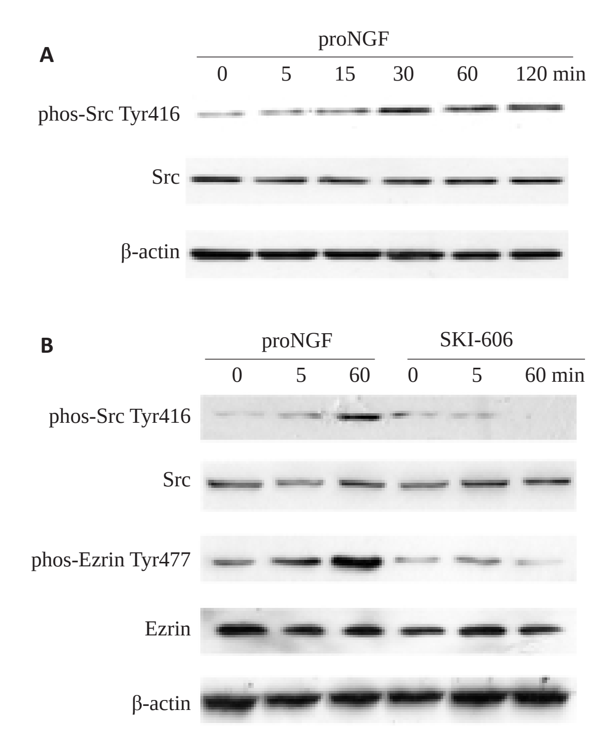


图3 proNGF通过激活乳腺癌细胞MDA-MB-231Src激酶使得ezrin Tyr477磷酸化

Fig.3 proNGF increases the phosphorylation of ezrin Tyr477 by activating Src in MDA-MB-231 cells. *A*: proNGF activates Src by increasing the phosphorylation of Src Tyr416 in a time-dependent manner; *B*: Src-specific inhibitor SKI-606 inhibits Src activation and the phosphorylation of ezrin Tyr477 induced by proNGF.

活相关联[5]。考虑到有报道ezrin Tyr477位点磷酸化是由Src激酶激活所致，我们研究了proNGF促进ezrin Tyr477的磷酸化是否是由Src激酶激活引起。如图3A所示，随着proNGF处理MDA-MB-231细胞时间的延长，Src Tyr416水平逐渐升高，直至120 min处于最高，表明proNGF处理激活了Src激酶。当用Src激酶特异抑制剂SKI-606（10 μmol/L）处理乳腺癌细胞MDA-MB-231后（图3B），不仅抑制了proNGF对Src激酶的激活，而且ezrin Tyr477位点磷酸化也相应的降低。

2.4 pEnter-His-ezrinY477F显性负突变质粒抑制proNGF促进的phos-ezrin Tyr477磷酸化和乳腺癌细胞侵袭

用基因定点突变技术，将pEnter-His-ezrin质粒中ezrin基因477位点的酪氨酸突变成苯丙氨酸，从而使ezrin失去在477位点磷酸化的能力。这种pEnter-His-ezrinY477F质粒对野生型ezrin Tyr477的磷酸化起抑制作用，pEnter-His-ezrinY477F是显性负突变质粒。因此，在细胞中过表达pEnter-His-ezrinY477F，可以研究ezrin Tyr477的磷酸化在proNGF促进乳腺癌细胞侵袭中的作用。在MDA-MB-231细胞中，瞬时转染pEnter-His空质粒载体、pEnter-His-ezrin质粒、pEnter-His-ezrinY477F质粒，免疫印迹检测ezrin、phos-ezrin Tyr477水平。转染了pEnter-His-ezrin质粒和pEnter-His-ezrinY477F质粒的细胞ezrin表达水平显著性升高，前者phos-ezrin Tyr477水平也相应地升高，而后者phos-ezrin Tyr477未发生改变（图4A）。用10 ng/mL proNGF处理转染了pEnter-His空载体质粒和pEnter-His-ezrinY477F质粒的MDA-MB-231细胞，再在体外做Transwell小室实验，16 h后检测各组MDA-MB-231细胞的侵袭能力。转染空载体的一组，proNGF处理之后MDA-MB-231细胞侵袭数提高了508%；而转染pEnter-His-ezrinY477F质粒的一组，proNGF刺激处理之后MDA-MB-231细胞侵袭数只提升了84%（图4B、C）。说明ezrinY477F突变，抑制了proNGF促进MDA-MB-231细胞侵袭的作用，即ezrin Tyr477的磷酸化在proNGF促进乳腺癌细胞侵袭中起关键作用。

3 讨论

我们的研究表明：ezrin Tyr477的磷酸化在proNGF促进乳腺癌细胞侵袭中起关键作用，proNGF促进乳腺癌细胞的转移依赖于ezrin Tyr477的磷酸化。

乳腺癌细胞能通过自分泌NGF[16]和proNGF[5]。NGF能抑制乳腺癌细胞的凋亡[17]，促进乳腺癌细胞增殖[18]，NGF也与促进乳腺癌转移有关[1, 19-20]，但体外实验表明，proNGF促进乳腺癌细胞的侵袭所需浓度比proNGF高十多倍，乳腺癌细胞对proNGF的应答更为

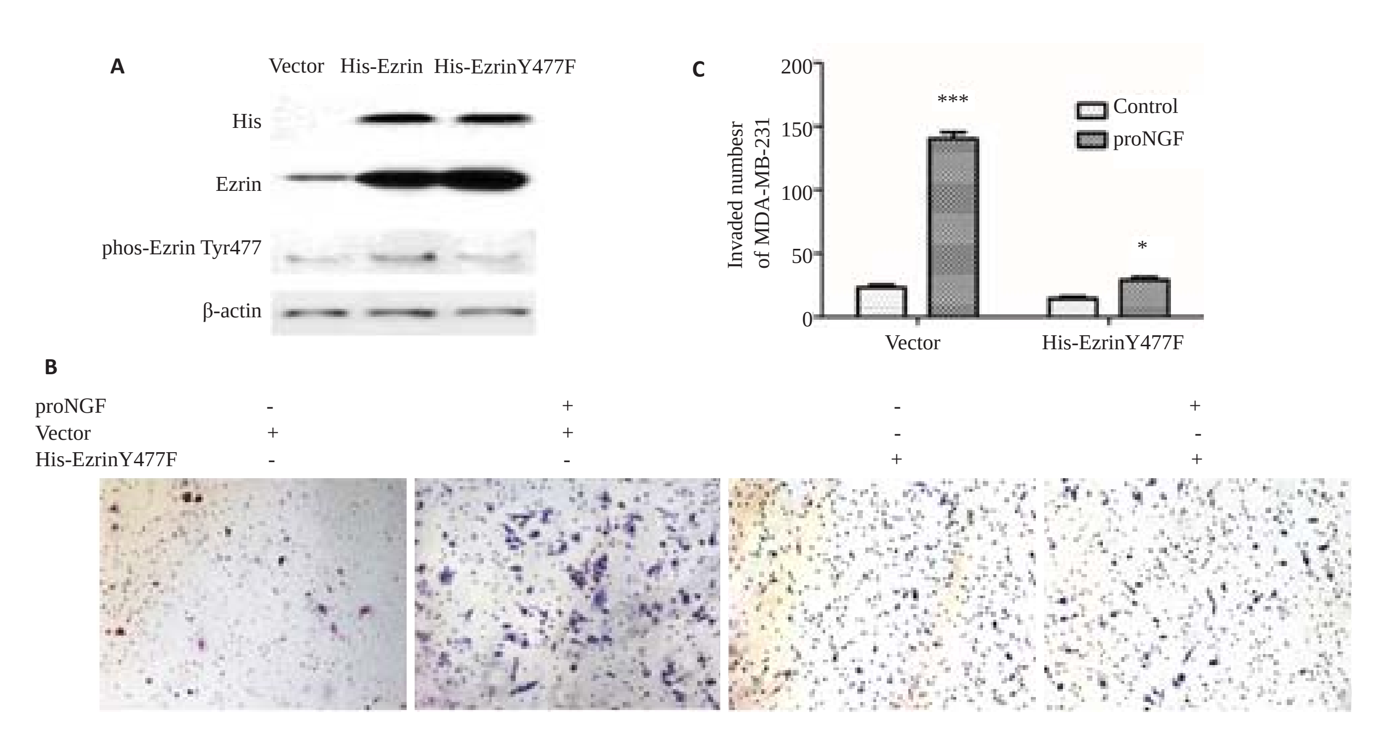


图4 pEnter-His-ezrinY477F显性负突变质粒抑制proNGF促进的MDA-MB-231乳腺癌细胞ezrin Tyr477磷酸化和侵袭

Fig.4 Dominent negative plasmid pEnter-His-ezrinY477F inhibits phosphorylation of ezrin Tyr477 and invasion induced by proNGF in MDA-MB-231 cells. *A*: pEnter-His-ezrinY477F inhibits phosphorylation of ezrin Tyr477 induced by proNGF in MDA-MB-231 cells; *B* Transwell assay (Original magnification: ×400), *C*: pEnter-His-ezrinY477F inhibited invasion of MDA-MB-231 cells induced by proNGF. *P<0.05, ***P<0.005.

敏感[5]，这是本研究选择proNGF而没有选择NGF作为研究对象的原因之一。NGF和proNGF结合的受体及信号转导途径的差异，可能是其促进乳腺癌细胞侵袭差异性的基础。NGF通过结合p75NTR和TrkA异二聚体受体[21]激活NF-κB和MAPK信号通路，proNGF是通过和异二聚体受体TrkA和sortlin结合，激活下游Src激酶[5, 21]。本研究结果也显示，proNGF也可激活Src激酶，proNGF能大幅增强乳腺癌细胞系MDA-MB-231和MCF-7的侵袭能力，且其对MDA-MB-231的效应要强于MCF-7。

由于proNGF促进乳腺癌侵袭过程中激活了Src激酶[5]，且有文献报道表明，ezrin Tyr477位点的磷酸化是由Src激酶的激活所致[15]，于是我们进一步研究proNGF促进乳腺癌细胞的侵袭是否与ezrin Tyr477的磷酸化有关。实验结果表明，proNGF刺激的乳腺癌细胞，ezrin的表达和ezrin Thr567的磷酸化均没发生改变，但是ezrin Tyr477的磷酸化水平显著升高，且这种磷酸化水平的升高是由Src激酶的激活所致，因为Src激酶特异性抑制剂SKI-606能抑制proNGF对癌细胞Src激酶的激活，同时降低ezrin Tyr477磷酸化水平。为了进一步研究proNGF促进乳腺癌细胞侵袭是否依赖于ezrin Tyr477的磷酸化，我们构建了显性负突变质粒pEnter-His-ezrinY477F转染MDA-MB-231细胞，实验结果表明，显性负突变质粒抑制proNGF对乳腺癌细胞侵袭的促进作用，说明proNGF促进乳腺癌细胞侵袭依赖于ezrin Tyr477的磷酸化，ezrin Tyr477的磷酸化在proNGF促进乳腺癌细胞的侵袭中起关键作用。值得进一步研究的是，为什么ezrin Tyr477磷酸化能促进侵袭乳腺癌细胞的迁移。

综上所述，ezrin Tyr477磷酸化在proNGF促进乳腺癌细胞侵袭中扮演非常关键的角色，这提示ezrin是proNGF促进乳腺癌侵袭信号途径中重要的信号分子，抑制ezrin Tyr477磷酸化及可能的下游信号分子，可能成为防治疗肿瘤的转移的新策略。

参考文献：

[1] Tomellini E, Touil Y, Lagadec C, et al. Nerve growth factor and proNGF simultaneously promote symmetric self-renewal, quiescence, and epithelial to mesenchymal transition to enlarge the breast cancer stem cell compartment[J]. Stem Cells, 2015, 33(2): 342-53.

[2] Hurst NJ, Najy AJ, Ustach CV, et al. Platelet-derived growth factor-C (PDGF-C) activation by serine proteases: implications for breast cancer progression[J]. Biochem J, 2012, 441(3): 909-18.

[3] Previdi S, Maroni P, Matteucci E, et al. Interaction between human-breast cancer metastasis and bone microenvironment through activated hepatocyte growth factor/Met and beta-catenin/Wnt pathways[J]. Eur J Cancer, 2010, 46(9): 1679-91.

[4] Wang JS, Wang FB, Zhang QG, et al. Enhanced expression of Rab27A gene by breast cancer cells promoting invasiveness and the

metastasis potential by secretion of insulin-like growth factor-II[J]. Mol Cancer Res, 2008, 6(3): 372-82.

[5] Demont Y, Corbet C, Page A, et al. Pro-nerve growth factor induces autocrine stimulation of breast cancer cell invasion through tropomyosin-related kinase A (TrkA) and sortilin protein[J]. J Biol Chem, 2012, 287(3): 1923-31.

[6] Kim LC, Song LX, Haura EB. Src kinases as therapeutic targets for cancer[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2009, 6(10): 587-95.

[7] Varkaris A, Katsiampoura AD, Araujo JC, et al. Src signaling pathways in prostate cancer[J]. Cancer Meta Rev, 2014, 33(2/3, SI): 595-606.

[8] Guarino M. Src signaling in cancer invasion[J]. J Cell Physiol, 2010, 223(1): 14-26.

[9] Elsberger B. Translational evidence on the role of Src kinase and activated Src kinase in invasive breast cancer[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2014, 89(3): 343-51.

[10] Fiévet B, Louvard D, Arpin M. ERM proteins in epithelial cell organization and functions[J]. Biochim Biophys Acta, 2007, 1773 (5): 653-60.

[11] Bretscher A, Edwards K, Fehon RG. ERM proteins and Merlin: integrators at the cell cortex[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002, 3(8): 586-99.

[12] Furutani Y, Matsuno H, Kawasaki M, et al. Interaction between telencephalin and ERM family proteins mediates dendritic filopodia formation[J]. J Neurosci, 2007, 27(33): 8866-76.

[13] Hoskin V, Szeto A, Ghaffari A, et al. Ezrin regulates focal adhesion and invadopodia dynamics by altering calpain activity to promote breast cancer cell invasion[J]. Mol Biol Cell, 2015, 2(12):616-27.

[14] Adada MM, Canals D, Jeong N, et al. Intracellular sphingosine kinase 2-derived sphingosine-1-phosphate mediates epidermal growth factor-induced ezrin-radixin-moesin phosphorylation and cancer cell invasion[J]. FASEB J, 2015, 29(11): 4654-69.

[15] Mak H, Naba A, Varma S, et al. Ezrin phosphorylation on tyrosine 477 regulates invasion and metastasis of breast cancer cells[J]. BMC Cancer, 2012, 12: 82.

[16] Dollé L, El Yazidi-Belkoura I, Adriaenssens E, et al. Nerve growth factor overexpression and autocrine loop in breast cancer cells[J]. Oncogene, 2003, 22(36): 5592-601.

[17] Yazidi-Belkoura YI, Adriaenssens E, Dolle L, et al. Tumor necrosis factor receptor-associated death domain protein is involved in the neurotrophin receptor-mediated antiapoptotic activity of nerve growth factor in breast cancer cells[J]. J Biol Chem, 2003, 278(19): 16952-6.

[18] Descamps S, Toillon RA, Adriaenssens E, et al. Nerve growth factor stimulates proliferation and survival of human breast cancer cells through two distinct signaling pathways[J]. J Biol Chem, 2001, 276 (21): 17864-70.

[19] Dollé L, Oliveira MJ, Bruyneel E, et al. Nerve Growth Factor mediates its pro-invasive effect in parallel with the release of a soluble E-cadherin fragment from breast cancer MCF-7/AZ cells [J]. J Dairy Res, 2005, 72(1): 20-6.

[20] Romon R, Adriaenssens E, Lagadec C, et al. Nerve growth factor promotes breast cancer angiogenesis by activating multiple pathways[J]. Mol Cancer, 2010, 9: 157.

[21] Bradshaw RA, Pundavela J, Biarc J, et al. NGF and ProNGF: regulation of neuronal and neoplastic responses through receptor signaling[J]. Adv Biol Regul, 2015, 58: 16-27.

(编辑:经 媛)